報 文

マウスを用いた受身腹壁アナフィラキシー (PAA) 反応の開発と
食品の抗アレルギー効果検索への応用

(平成 10 年 1 月 5 日受理)

福井久恵^{*1} 片岡裕美^{*1} 扇間昌規^{*1}
伊藤誉志男^{*1} 高垣裕^{*2}Development of the Mouse Passive Abdominal Wall Anaphylaxis (PAA) Method
and Application of the Method to Search for Anti-allergic Effect of FoodsHisae FUKUI^{*1}, Hiromi KATAOKA^{*1}, Masanori SEMMA^{*1}, Yoshio ITO^{*1}
and Yutaka TAKAGAKI^{*2}(*¹Faculty of Pharmaceutical Sciences, Mukogawa Women's University: 11-68, Koshien
Kyuban-cho, Nishinomiya 663-8179, Japan; *²Osaka Prefectural Institute of
Public Health: 1-3-69, Nakamichi, Higashinari-ku, Osaka 537-0025, Japan)

Food allergy, which generally belongs to the category of Type I hypersensitivity reaction, is a serious health problem. Previously, we reported two types of mouse anaphylactic models, one using the abdominal wall as a site for both induction and estimation (AW method), and the other estimating the hypotension in mice sensitized passively with mouse monoclonal anti-DNP IgE.

In this paper, we propose a passive abdominal wall anaphylaxis (PAA) method for use in screening for anti-allergic substances. Normal mice were intraperitoneally sensitized with mouse monoclonal anti-DNP IgE (5 μ g/mouse) and 24 hours later, challenged with dinitrophenyl human serum albumin (10 μ g/50 μ L/site) on the abdominal wall. The PAA was estimated in terms of the increase of vascular permeability at the challenged abdominal wall site.

The PAA was inhibited by the oral preadministration of diphenhydramine in a dose-dependent manner (PAA inhibition, PAAI). The anti-allergic activities of such well-known anti-allergic foods as oolong tea, garlic, and leek were confirmed by the PAAI test. Therefore, the PAA method appears to be applicable for the screening of anti-allergic substances in foods, simply, rapidly, and with high sensitivity.

(Received January 5, 1998)

Key words: 腹壁 abdominal wall; 受動感作 passive sensitization; 受身腹壁アナフィラキシー passive abdominal anaphylaxis; 食品抗アレルギー効果 food anti-allergic effect

緒 言

現在、深刻な社会問題となっている疾患の 1 つに食物アレルギーがある。食物アレルギーは食物成分をアレ

ルゲンとして引き起こされ、一般に I 型アレルギーに分類されるものが多い。その機序は、アレルゲンの侵入によって生じた抗原特異的な IgE が、肥満細胞に結合している間に、対応抗原が再び侵入することにより IgE が架橋されることが引き金となっている。その結果、肥満細胞からヒスタミンを代表とする種々の化学伝達物質が放出され、膨疹、血管透過性亢進、血圧低下などの症

*¹ 武庫川女子大学薬学部: 〒663-8179 兵庫県西宮市甲子園九番町 11-68

*² 大阪府立公衆衛生研究所: 〒537-0025 大阪市東成区中道 1-3-69

状が起きる。

食品はこのようにアレルギーの原因となるが、食品にはアレルギーを抑制したり軽減する成分を含んでいるものがある^{1)~3)}。食品の抗アレルギー効果の簡便で正確な評価法の開発は、アレルギーを予防し、人の健康維持を考える上できわめて重要な意味を持つ。

以前、著者らは、マウスに mouse monoclonal anti-DNP IgE 抗体 (Mm IgE) で感作後、ジニトロフェニルヒト血清アルブミン (DNP-HSA) で惹起される受身アナフィラキシー性血圧降下の抑制を指標とした抗アレルギー性食品の評価法を報告した⁴⁾。本法は、正常マウスに直接 Mm IgE を投与することで生体内での抗体産生期間が省略することができ、迅速にアナフィラキシー反応を誘発することができる。また、著者らは、抗原で能動的に感作したマウスに同一抗原を腹壁に注射することによって、腹壁上に生じる血管透過性の亢進度を指標として評価できる局所アナフィラキシー反応の誘発法 (AW 法) を報告した⁵⁾。AW 法は、簡便に、高感度に、再現性良くアナフィラキシー反応を評価することができる。

著者らは今回、更に迅速なアッセイ法を確立することを目的として、受動感作の迅速性と、AW 法の簡便さの利点を組み合わせた受身腹壁アナフィラキシー (passive abdominal wall anaphylaxis: PAA) 法を考案し、PAA 誘発の最適条件を確立したので報告する。

更に、PAA が H1 ブロッカーであるジフェンヒドミンの経口前投与で、用量依存的に再現性良く抑制されることを証明した。この反応、すなわち受身腹壁アナフィラキシー抑制 (PAA inhibition: PAAI) を指標として、食品の抗アレルギー効果の探索試験に応用できることを確認した。

PAA 法と類似の局所アナフィラキシー誘発方法に、受身皮膚アナフィラキシー (passive cutaneous anaphylaxis: PCA) 反応⁶⁾ が知られている。PCA 法では、マウス耳部を用いた場合、耳介組織からの色素抽出、吸光度測定などが必須である⁷⁾。また、ラット背部を用いたときは、あらかじめ、剪毛などの操作が必要となる。これらは、一回の実験で多量の動物を使用するときには特に煩雑なものとなる。PAA 法は、PCA 法と比較して、上述のような欠点を補うことができるという利点がある。

実験方法

1. 試 薬

Mouse IgE は、monoclonal anti-DNP IgE 抗体 (Mm IgE, H1 DNP- ϵ -26.82) を用いた⁸⁾。

ジニトロフェニルヒト血清アルブミン (DNP-HSA) は、シグマ社より購入した (アルブミン 1 分子当たり、30~40 個のジニトロフェニル基を含有)。ジフェンヒドミン塩酸塩はナカライテスク社より購入した。

2. 試 料

食品試料 (ウーロン茶葉、にんにく、にら、しそ、だいこん) は、すべて市販品をコープ浜甲子園店より購入した。

3. 実験動物

ddY 系雄性マウス 5 週齢 (日本 SLC (株)) を用いた。固形飼料 (CE-2, 日本クレア (株)) 及び水を自由に与えて、 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ で飼育した。

4. 試料調製

にんにく、にら、しそ、だいこんは、可食部 4.0 g に、35.0 mL の精製水を加えフードミルで磨砕後、精製水で全量を 40.0 mL とした。続いて遠心分離 (3,000 rpm, 10 min, 0°C) した上清を食品試料溶液とした。また、ウーロン茶葉は 10 倍量の沸騰精製水で 10 分間抽出し、ろ過したものを食品試料溶液とした。

5. PAA 法

正常マウスに Mm IgE を投与することで、受動的に感作を行った。感作成立後、片岡らの操作手順⁹⁾に従って 1% エバンスブルー溶液を静脈内注射し、続けて腹壁に DNP-HSA を注射 ($50 \mu\text{L}/\text{site}$) することにより PAA を誘発した。

PAA の評価は、腹壁上に出現した色素斑の直径 (xmm) から定義される血管透過性値 (Vascular Permeability Value: VPV) により行った (VPV = 0, $x < 1.5$; VPV = 25, $1.5 \leq x < 4.5$; VPV = 50, $4.5 \leq x < 7.5$; VPV = 75, $7.5 \leq x < 12.5$; VPV = 100, $12.5 \leq x$)⁵⁾。

統計処理

VPV は平均値 $\pm$ 標準誤差で示した。また、検査群と対照群の間で Fisher の PLSD テストにより有意差検定をした。

結果及び考察

1. PAA における Mm IgE 量の検討

正常マウスに $0.01 \sim 10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の Mm IgE で腹腔内に受動感作をし、24 時間後に DNP-HSA ($2 \text{mg}/\text{mL}$) で誘発される腹壁上の VPV を Fig. 1 に示した。VPV は、Mm IgE 量に依存して増加し、 $0.5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ 以上の Mm IgE で有意な PAA が誘発されることが確認された。

Leng ら⁹⁾により報告されているラットの背部を用いた PCA 反応では、 $27 \text{mg}/\text{kg}$ の anti-DNP IgE (静脈内投与) を使用している。この PCA 反応と比較して著者らの提案した PAA 反応は非常に高感度な方法である (約 $0.02 \text{mg}/\text{kg}$ 、腹腔内投与)。

また、Fig. 1 は $0.5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ より $5 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の抗体量の方が、より安定したアナフィラキシーを誘発できることを示している。

血圧降下を指標とした場合、十分なアナフィラキシーを誘発するには、 $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ の投与量⁴⁾が必要であったが、PAA 法ではその $1/2$ 量で確実に誘発するこ

Fig. 1. Dose response of mouse monoclonal anti-DNP IgE antibody (Mm IgE) on passive abdominal wall anaphylaxis (PAA)

Normal mice were passively sensitized intraperitoneally with different doses of Mm IgE, and 24 hours later, challenged with dinitrophenyl human serum albumin (2 mg/mL, 100 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}/\text{site}$) on the abdominal wall. Each VPV (vascular permeability value) represents the mean $\pm$ S.E. for 5 mice. VPVs were defined as follows by the diameter (x mm) of the dyed area. (VPV=0, $x < 1.5$; VPV=25, $1.5 \leq x < 4.5$; VPV=50, $4.5 \leq x < 7.5$; VPV=75, $7.5 \leq x < 12.5$; VPV=100, $12.5 \leq x$) Statistical estimations were performed by analysis of variance, followed by Fisher's PLSD test. Asterisks indicate significant differences from the non-sensitized control group (** $p < 0.001$, * $p < 0.05$).

とが可能であった。

2. PAAにおけるMm IgEの投与部位の検討

1 μg と 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の Mm IgE を用いて、腹腔内と静脈内感作の違いによる VPV の影響を比較した。惹起は 1 と同様に、24 時間後に DNP-HSA (2 mg/mL) で行った (Fig. 2)。

その結果、腹腔内投与の方が静脈内投与より高い VPV が得られた。これは、血圧降下を指標とした場合と同様であった。

3. 惹起におけるDNP-HSA濃度の検討

Fig. 3 に示すように 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ の Mm IgE で感作したマウスを用いて、惹起における DNP-HSA 濃度の影響を検討した。その結果、DNP-HSA は、0.02 mg/mL で誘発可能であり、更に、再現性良く十分な VPV を得るためには 0.2 mg/mL の DNP-HSA 量が適していた (10 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}/\text{site}$)。

Fig. 2. Comparison of the administration routes and doses of mouse monoclonal anti-DNP IgE antibody (Mm IgE) on PAA

Normal mice received Mm IgE of 1 μg or 5 μg , either intraperitoneally or intravenously, were challenged 24 hours later with dinitrophenyl human serum albumin (2 mg/mL, 100 $\mu\text{g}/50\mu\text{L}/\text{site}$) on the abdominal wall. Each VPV (vascular permeability value) represents the mean $\pm$ S.E. for 3~5 mice. Statistical analyses were as in Fig. 1 (** $p < 0.001$).

Fig. 3. Dose response of dinitrophenyl human serum albumin (DNP-HSA) on PAA

Normal mice were intraperitoneally sensitized with mouse monoclonal anti-DNP IgE antibody (Mm IgE) of 5 $\mu\text{g}/\text{mouse}$, 24 hours later, challenged with different concentrations of DNP-HSA on the abdominal wall. Each VPV (vascular permeability value) represents the mean $\pm$ S.E. for 4~5 mice. Statistical analyses were as in Fig. 1 (** $p < 0.001$, ** $p < 0.005$).

このことから、DNP-HSA の投与量は血圧降下を指標とした場合⁴⁾と比較して 1/10 量であり、PAA 法は高感

度にアナフィラキシーを誘発できることが明確となった。

4. 受動感作における誘発期間の検討

Mm IgE (5 μ g/mouse) の腹腔内投与後、経時的に惹起 (0.2 mg/mL-DNP-HSA, 10 μ g/50 μ L/site) を行つて得られた VPV の変化を、Fig. 4 に示した。この結果より、PAA は受動感作後、1 日目から 4 日目が最も高感度であることが確認できた。この受動感作における誘発期間は、Leng ら⁹⁾ のラット背部 PCA 反応における結果と類似するものであった。

一方、能動感作の場合には、7 日目から 21 日目の長期間にわたり誘発が可能であり⁹⁾、受動感作とは大きく異なっていた。この差の原因は、受動感作では一回限りの IgE 投与であるが、能動感作ではサイトカイン類の刺激などが持続する期間中、IgE が産生、供給されることによるとと思われる。

5. ジフェンヒドラミンによる PAA の抑制

Mm IgE (5 μ g/mouse) を腹腔内投与して受身感作したマウスに、惹起の 1 時間前に H1 ブロッカーであるジ

Fig. 4. Time course of PAA

Normal mice were sensitized with mouse monoclonal anti-DNP IgE antibody (Mm IgE) (5 μ g/mouse) intraperitoneally, challenged with dinitrophenyl human serum albumin (0.2 mg/mL, 10 μ g/50 μ L/site) on the abdominal wall at the indicated days after sensitization. Mice in the control group were not sensitized, but were maintained and challenged under the same conditions as the experimental group. Each VPV (vascular permeability value) represents the mean $\pm$ S.E. for 3~5 mice. Statistical analyses were as in Fig. 1. Asterisks indicate significant differences from the control group of day 0 (***) $p < 0.001$, (*) $p < 0.05$.

フェンヒドラミンを経口投与し、PAA の抑制 (PAA inhibition: PAAI) を検討した (Fig. 5).

その結果、血圧降下を指標とした場合と同様に、VPV はジフェンヒドラミンの経口前投与により用量依存的に抑制された。このことから、PAAI を指標とすることで、血圧降下の抑制を指標にするよりも、簡便に、高感度に I 型アレルギーに対する食品の抗アレルギー効果、薬物の探索に利用できることが示唆された。

抗アレルギー性物質の探索に受動感作を用いる利点は、能動感作のように抗原投与後マウス体内での抗体産生期間を省略できるので、受動感作後、翌日には試験を開始できる点にある。欠点としてはメカニズム的に惹起を抑制する成分の探索に限定される点にある。したがって、PAA 法の長所を活用して、抗アレルギー性物質の第一スクリーニングを迅速、簡便、高感度に行うことのできる PAAI 試験は有用であると思われる。

6. 食品試料の PAAI 試験

PAAI を抗アレルギー性食品の探索試験に応用した。食品試料としては、抗アレルギー作用があるとされている^{1)~3)}、ウーロン茶、にんにく、にら、しそ及び、著

Fig. 5. Inhibition of passive abdominal anaphylaxis (PAAI) by diphenhydramine hydrochloride

Normal mice were intraperitoneally sensitized with mouse monoclonal anti-DNP IgE antibody (Mm IgE) (5 μ g/mouse). Twenty-four to 72 hours after sensitization, they were challenged with dinitrophenyl human serum albumin (0.2 mg/mL, 10 μ g/50 μ L/site) on the abdominal wall. Different concentrations of diphenhydramine hydrochloride were administered orally an hour prior to challenge. Each VPV (vascular permeability value) represents the mean $\pm$ S.E. for 3~4 mice. Statistical analyses were as in Fig. 1 (***) $p < 0.001$.

Fig. 6. Inhibition of passive abdominal anaphylaxis (PAAI) by foods

Normal mice were sensitized intraperitoneally with mouse monoclonal anti-DNP IgE antibody (Mm IgE) of 5 μ g/mouse. Twenty-four to 72 hours after sensitization, they were challenged with dinitrophenyl human serum albumin (0.2 mg/mL, 10 μ g/50 μ L/site) on the abdominal wall. The extract solutions of indicated foods of 0.2 mL were administered orally an hour prior to challenge. Each VPV (vascular permeability value) represents the mean $\pm$ S.E. for 4~6 mice. Statistical analyses were as in Fig. 1. Asterisks indicate significant differences from the positive control group (*** p < 0.001, ** p < 0.005, * p < 0.05).

者らの前回の報告⁴⁾で抗アレルギー作用が認められなかっただいこんの5品目を用いた。PAAI試験には、塩崎ら²⁾、飛松ら⁴⁾に従って食品試料溶液を惹起の1時間前にゾンデを用いて経口投与 (0.2 mL/mouse) した (Fig. 6)。

その結果、ウーロン茶、にんにく、にらでは有意なPAAIが確認でき、だいこんではPAAI効果を示さなかった。本法で用いたにんにく、にらの食品試料溶液は、前回⁴⁾の試料の1/10濃度であるので、より高感度に食品の抗アレルギー効果の検査ができることが示唆された。一方、しそは、PAAI効果を示す傾向が見られたものの有意差を示すには至らなかった。これは、試料の濃度が低かったためか、しそ中の抗アレルギー性成分の有効な抽出には熱水³⁾が必要であったためなどが考えられる。このことから、今後の食品試料の調製には複数の抽出法、濃度で行う必要があると思われる。

今回の予備実験結果から、PAAIを指標として食品の

抗アレルギー効果の簡便なスクリーニングが可能であると示唆された。

総括

(1) PAA (受身腹壁アナフィラキシー) 法は正常マウスを Mm IgE で受動感作後、DNP-HSA を腹壁に注射することにより、局所アナフィラキシーを再現性良く誘発できる。

(2) Mm IgE 量は、0.5 μ g/mouse 以上の腹腔内投与で有意な PAA の誘発が可能であった。更に確実に再現性良く PAA をおこすための抗体量は 5 μ g/mouse であった。

(3) Mm IgE (5 μ g/mouse, i.p.) で感作したマウスは 0.2 mg/mL-DNP-HSA, 10 μ g/50 μ L/site で再現性良く十分な VPV を得ることができた。

(4) PAA は受動感作後、1~4 日間で高感度であった。

(5) PAA は H1 ブロッカーであるジフェンヒドラミンによって用量依存的に抑制された。このことから、PAA の抑制 (PAAI) を指標とした本法を I 型アレルギーに対する食品の抗アレルギー効果、薬物探索のスクリーニングに応用できることが示唆された。

(6) 抗アレルギー作用があると言われているウーロン茶、にんにく、にらで有意な PAAI が認められた。

文 献

- 1) 関谷敬三: ぶんせき 8, 656~661 (1997).
- 2) 塩崎哲也, 杉山 清, 中里賢一, 竹尾忠一: 薬誌. 117, 448~454 (1997).
- 3) 上田浩史, 山崎正利: 和漢医薬学雑誌 12, 392~393 (1995).
- 4) 飛松佳江, 片岡裕美, 平澤玲子, 井上朋美, 開原亜樹子, 小林由紀, 澤 典子, 扇間昌規, 伊藤善志男, 高垣 裕: 日食化誌. 4, 17~20 (1997).
- 5) Kataoka, H., Tsuda, A., Tsuda Y., Baba, A., Yoshida, H., Hirasawa, R., Tobimatsu, Y., Nishiguchi, M., Semma, M., Ito, Y.: Biol. Pharm. Bull. 20, 714~716 (1997).
- 6) 大内和雄: “生物薬科学実験講座, 炎症とアレルギー, 12, I-1” p. 96 (1993) 廣川書店.
- 7) Inagaki, N., Miura, T., Magaki, H., Ono, Y., Koda, A.: Int. Arch. Allergy Appl. Immunol. 87, 254~259 (1988).
- 8) Liu, F.-T., Bohn, J. W., Ferry, E. L., Yamamoto, H., Molinaro, C. A., Sherman, L. A., Klinman, N. R., Katz, D. H.: J. Immunol. 124, 2728~2737 (1980).
- 9) Leng, W., Kuo, C. G., Qureshi, R., Jakschik, B. A.: *ibid.* 140, 2361~2368 (1988).